

# 半胱氨酸对马铃薯多酚氧化酶的抑制作用

邱龙新<sup>1,2</sup>, 黄浩<sup>1</sup>, 陈清西<sup>1,\*</sup>

(1. 厦门大学生物化学与生物技术系, 教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 龙岩学院生物科学与工程系 福建 龙岩 364000)

**摘要:** 马铃薯在保藏和加工过程中容易发生褐变, 是因为其多酚氧化酶的作用结果。实验发现 L- 半胱氨酸对该酶有明显的抑制作用, 它的作用可以导致马铃薯多酚氧化酶的酶促反应的迟滞时间延长, 同时使稳态酶活力下降。其导致酶活力下降 50% 的抑制剂浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $100\mu\text{mol/L}$ 。L-Cys 对马铃薯多酚氧化酶的效应为不可逆的抑制, 它作用于马铃薯多酚氧化酶活性而抑制褐色产物的产生, 起到对马铃薯的保鲜作用。

**关键词:** 马铃薯; 多酚氧化酶; 半胱氨酸; 抑制作用机理

## Inhibitory Effect on Potato Polyphenol Oxidase Activity by L-Cysteine

QIU Long-xin<sup>1,2</sup>, HUANG Hao<sup>1</sup>, CHEN Qing-xi<sup>1,\*</sup>

(1. The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Department of Biochemistry and Biotechnology, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Department of Biology Science and Engineering, Longyan University, Longyan 364000, China)

**Abstract:** In this paper, L-Cysteine was discovered to have a strong inhibition on potato polyphenol oxidase activity. The existence of L-Cysteine resulted in prolonging the lag time of the enzyme reaction, while the steady-state rate of the enzyme activity decreased with the increase of concentration of L-Cysteine. The  $IC_{50}$ , inhibitor's concentration leading to 50% activity lost, was estimated to be  $100\mu\text{mol/L}$ . The inhibition kinetics and mechanism of L-Cysteine on the potato PPO activity have been studied. The results showed that inhibition of L-Cysteine on the enzyme is an irreversible reaction. It has a direct effect on the enzyme activity, which inhibit the production of o-quinones to stop the enzymatic browning of potato.

**Key words:** potato; polyphenol oxidase; L-Cysteine; inhibition kinetics

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)04-0037-04

多酚氧化酶 (EC.1.14.18.1, 简称 PPO) 在动植物体酶促褐变、体内色素合成的过程中起了关键的作用<sup>[1]</sup>。它能将酪氨酸羟化, 产生邻位二羟基苯丙氨酸 (L-多巴), 然后再将多巴氧化成多巴醌, 进而生成一系列引起褐变的色素物。因此, 目前国内外已研究了大量的化学物质对多酚氧化酶的抑制作用, 以期寻找高效的抑制剂来用作食品加工中的保鲜剂。半胱氨酸, 作为一种高效的、安全的多酚氧化酶抑制剂, 其在食品保鲜中的应用已得到一些研究<sup>[2]</sup>。目前, 有关半胱氨酸对多酚氧化酶的抑制作用机理的研究仍存在争论<sup>[3]</sup>。半胱氨酸对马铃薯多酚氧化酶的效应的研究也没有开展过。本文以半胱氨酸为效应物, 研究其对马铃薯多酚氧化酶活力的影响, 探讨对酶的抑制作用机理, 以期进一步探讨半胱氨酸对

多酚氧化酶的抑制作用机理, 阐明其保鲜机理, 并为寻找更有效的多酚氧化酶抑制剂和为该酶抑制剂的分子设计奠定理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要材料

马铃薯 (无花号) 福建农林大学薯类研究室。

#### 1.2 主要试剂

L-DOPA (L-3,4-二羟基苯氨酸) Aldrich 化学公司; L-Cys (L-半胱氨酸) 北京化学试剂公司; 磷酸盐缓冲液 ( $0.2\text{mmol/L}$ , pH 6.8); Sephadex G-100 (葡聚糖凝胶) Pharmacia; 丙酮、硫酸铵等为国产分析纯试剂, 使用的蒸馏水为去离子重蒸水。

收稿日期: 2005-06-15

\* 通讯作者

基金项目: 福建省科技攻关课题 (2004N002); 福建省自然科学基金项目 (B0410003)

作者简介: 邱龙新 (1969-), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为食品化学。

### 1.3 主要仪器

电子分析天平(BS210S)、高速组织捣碎机(DS-1 型)、冷冻离心机(3K15, Sigma 公司)、冰箱、紫外可见分光光度计(Beckman UV-650 型)、磁力搅拌机(JB-2 型)。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 马铃薯 PP0 的分离纯化

将在 4℃ 冰箱中预冷的土豆洗净后去皮,切块后加入冷冻丙酮用高速组织捣碎机匀浆,然后用布氏漏斗抽滤,滤饼再用冷冻丙酮多次提取、抽滤至无色,继续抽干至无丙酮味,即制得马铃薯丙酮干粉,置于冰箱中冷冻保存。使用时将马铃薯丙酮干粉以 1:8(W:V)的比例溶于 0.2mol/L 磷酸缓冲溶液 pH6.8,搅拌 10min,在 4℃ 下 15000r/min 离心 15min,上清液过滤,即得马铃薯 PP0 的粗酶液。粗酶进一步用 40% 饱和度硫酸铵盐析,于 4℃ 下放置 10h,17000r/min 离心收集沉淀。沉淀用 0.2mol/L 磷酸缓冲溶液(pH6.8)溶解,透析,再次离心除去沉淀,获得上清液,最后经 Sephadex G-100 柱层析(2.5 × 60cm)进一步纯化,采用 0.2mol/L 磷酸缓冲溶液(pH6.8)洗脱,获得比活力为 430U/mg 的酶制剂。酶活力单位(U)定义为每分钟催化 L-DOPA 氧化产生 1μmol 的产物的酶量。

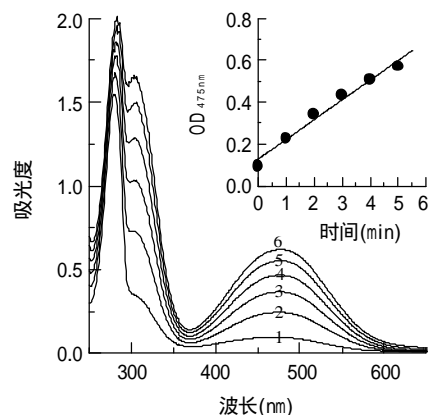
#### 1.4.2 多酚氧化酶的酶活力测定

按文献<sup>[4]</sup>方法,适当做部分修改。在 3.0ml 0.2mol/L 磷酸缓冲溶液(pH6.8)的反应体系中,以 0.5mmol/L DOPA 为底物,于 30℃ 恒温水浴保温预热 10min,然后加入 0.1ml 多酚氧化酶溶液,即刻充分混匀,在 30℃ 恒温条件下测定波长为 475nm 的光密度值随时间的增长直线的斜率计算出酶的活力,产物的消光系数按 3700L/(mol · cm) 计算<sup>[5]</sup>。L-Cys 对酶活力影响的实验是在测活体系中加入不同浓度的 L-Cys,按上述方法测定加入酶液后产物的形成量随时间的变化曲线,测定仪器为 Beckman UV-650 分光光度计。

## 2 结果与分析

### 2.1 马铃薯 PP0 催化底物 DOPA 氧化反应的吸收光谱变化

马铃薯 PP0 在 pH6.8 的磷酸缓冲液中能催化 DOPA 氧化成多巴醌,进而生成褐色的化合物,在 475nm 处有特征的吸收峰(见图 1),该峰随着反应时间的延长而呈直线上升(图 1 内插图)。因此,可以在 475nm 处监测产物的生成量随反应时间的变化,分析酶催化反应的活力。另外,当反应时间为 1min 时,在 305nm 处出现一个新的紫外吸收肩峰,并且该肩峰随着反应时间的延长而更加显著,反应时间 3min 以上,成为一个明显的吸收峰,该峰很可能是酶和多巴醌络合物引起的吸收峰<sup>[3]</sup>。



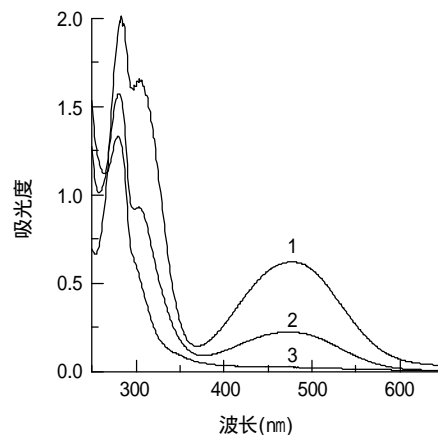
注: 曲线 1~6 反应时间分别为 0、1、2、3、4 和 5min, 内插图为 475nm 处的吸收峰与反应时间的关系。

图 1 马铃薯 PP0 催化多巴氧化过程的吸收光谱

Fig.1 Absorption spectra of potato polyphenol oxidase during the oxidation of L-DOPA

### 2.2 L-Cys 对马铃薯 PP0 催化 DOPA 氧化反应的吸收光谱的影响

测定酶在不含和分别含 100μmol/L 和 200μmol/L 的 L-Cys 的测活体系,催化 0.5mmol/L DOPA 氧化 5min 后的吸收光谱。测定结果见图 2,当 L-Cys 浓度为 100μmol/L 时,产物特征吸收峰(475nm)和酶-多巴醌络合物的特征吸收峰(305nm)均明显的下降(曲线 2)。说明 L-Cys 可能直接抑制酶的催化活力,从而阻止褐色产物的生成。

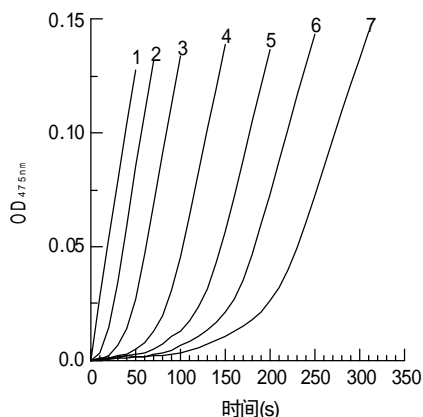


注: 曲线 1~3 的 L-Cys 浓度分别为 0、100 和 200μmol/L, 反应时间为 5min。

图 2 L-Cys 对马铃薯 PP0 催化多巴氧化的吸收光谱的影响  
Fig.2 Effect of L-Cys on the absorption spectra of potato polyphenol oxidase during the oxidation of L-DOPA

### 2.3 不同浓度 L-Cys 对马铃薯 PP0 底物反应曲线的影响

在含 0.5mmol/L DOPA 的测活体系中,加入不同浓度的 L-Cys 为效应物,研究 L-Cys 对马铃薯 PP0 活力的影响。在 475nm 处检测产物的生成量随反应时间的变



注：曲线1~7 L-Cys的浓度分别为：0、20、40、60、80和120  $\mu\text{mol/L}$

图3 半胱氨酸对马铃薯PPO抑制作用的进程曲线

Fig.3 Progress curves of potato polyphenol oxidase inhibited by L-Cysteine

化，分析酶催化反应的活力。图3为酶在含不同浓度L-Cys为效应物的测活体系中，测定酶促反应的进行曲线。曲线1为不含L-Cys的对照实验，得到一条通过原点的直线，显示产物的形成量随着反应时间的延长而成直线上升，酶催化反应不存在迟滞的现象。曲线2~7分别为酶在含20、40、60、80、100和120  $\mu\text{mol/L}$ 的L-Cys的测活体系中的反应进行曲线，显示产物的形成量在开始时是缓慢地上升，到一定时间后呈直线上升，反应体系达到恒定的斜率，说明反应达到稳态。直线部分的斜率为该酶的稳态活力，直线部分外延交于X-轴的截距为酶促反应的迟滞时间。

#### 2.4 L-Cys对马铃薯PPO的迟滞时间和稳态活力的影响

实验发现，在L-Cys存在时，马铃薯PPO的酶促反应出现迟滞时间的现象，并且迟滞时间随着L-Cys浓度的增大而延长，稳态的酶活力也随着抑制剂浓度的增大而下降。进一步测定L-Cys对酶促反应的迟滞时间和

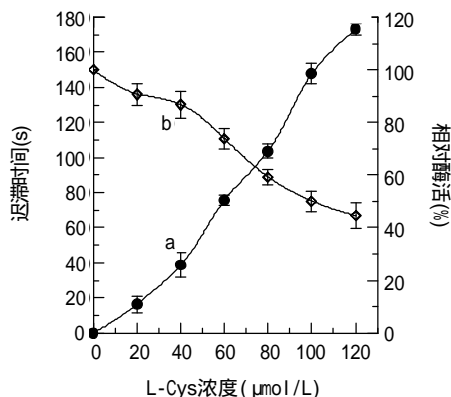
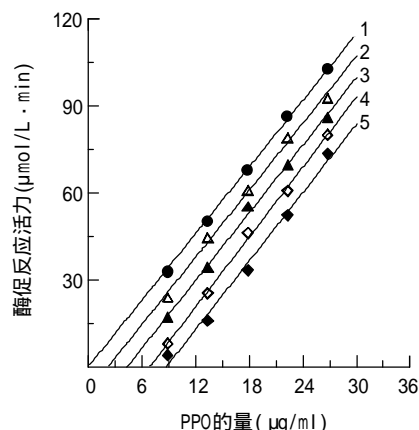


图4 L-Cys对马铃薯PPO酶促反应的迟滞时间(a)和稳态活力(b)的影响

Fig.4 Effects of L-Cys on the lag time (a) and steady-state rate (b) of potato polyphenol oxidase

稳态活力的影响，结果见图4。在没有L-Cys存在时，迟滞时间为0、20  $\mu\text{mol/L}$ 的L-Cys存在时酶促的迟滞时间为16.2s，而L-Cys浓度增大到120  $\mu\text{mol/L}$ 时，可以使酶促的迟滞时间延长至173s，与20  $\mu\text{mol/L}$ 的相比增大了10倍以上。而稳态的酶活力则随着抑制剂浓度的增大缓慢地下降，120  $\mu\text{mol/L}$ 的L-Cys使酶的稳态活力下降55.4%。测得导致酶活力下降一半的抑制剂浓度( $IC_{50}$ )为100  $\mu\text{mol/L}$ 。说明L-Cys对马铃薯PPO活力的抑制作用是通过延长酶促反应的迟滞时间和降低稳态的酶活力。

#### 2.5 L-Cys对马铃薯PPO的抑制作用表现为不可逆效应



注：曲线1~5半胱氨酸浓度分别为：0、8.33、12.5、16.67和20.83  $\mu\text{mol/L}$ 。

图5 半胱氨酸对马铃薯PPO抑制机理

Fig.5 Inhibitory mechanism of L-Cys on potato polyphenol oxidase

在测活体系中，固定底物(L-DOPA)浓度为0.5  $\text{mmol/L}$ ，加入不同浓度的L-Cys，改变加入的酶量，测定酶促反应的活力。以酶促反应活力与加入的酶量作图，见图5。得到一组平行直线，随着L-Cys浓度的增大，直线的斜率基本不变，但横轴的截距随着L-Cys浓度的增大而增大。说明L-Cys对酶的抑制作用属于不可逆过程，L-Cys是通过降低有效的酶量导致活力的下降。

### 3 讨论

目前认为L-Cys对多酚氧化酶的抑制机理有以下两种可能：硫醇类化合物可以结合酶活性中心的铜离子从而抑制酶的活力；硫醇类化合物可以在酶促反应过程中与生成的产物醌发生一快速的非酶催化反应而结合形成一种稳定的无色化合物<sup>[3]</sup>。通常认为起主要作用的是第二种可能。Valero<sup>[6]</sup>等在研究L-Cys对葡萄PPO的抑制作用时发现L-Cys与酶促反应生成的产物结合生成了一种更稳定的无色物质，同时他也认为L-Cys与酶不可逆地结合而抑制了酶活。Richard等<sup>[7]</sup>在研究L-Cys对苹果PPO的抑制作用时认为L-Cys与酶促反应生成的产物结合生成

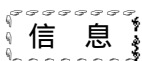
的无色物质是苹果 PPO 的竞争性抑制剂。Christine 等<sup>[3]</sup>研究棕榈 PPO 的结果显示 L-Cys 与酶促反应生成的产物结合生成一种无色物质,他们的结果同时也显示了 L-Cys 可能与酶蛋白发生了结合。

本文以 L-DOPA 为底物,研究 L-Cys 对马铃薯多酚氧化酶活力的影响,发现 L-Cys 对马铃薯多酚氧化酶活力具有强烈的抑制作用,其  $IC_{50}$  为  $100\mu\text{mol/L}$ 。反应进程曲线显示在 L-Cys 存在时,酶促反应具有迟滞现象,且 L-Cys 对马铃薯多酚氧化酶活力的影响主要表现在对迟滞时间的影响上。这可能是由于 L-Cys 作用于生成的产物,产生无色的物质,从而使酶促反应具有迟滞现象。L-Cys 可作用于马铃薯 PPO 酶促反应生成的产物而产生无色物质的可能性可以由本实验在  $200\sim 800\text{nm}$  范围扫描酶促反应生成产物情况的结果所证实。高碘酸钠可氧化 L-DOPA 产生醌类物质, L-Cys 存在时,其在  $475\text{nm}$  的产物峰下降或消失<sup>[8]</sup>,这与本实验 L-Cys 对马铃薯 PPO 酶促反应的作用结果类似。说明 L-Cys 可作用于马铃薯 PPO 酶促反应生成的产物而产生无色物质,这是 L-Cys 对马铃薯 PPO 的抑制作用机理之一。除此之外,根据 L-Cys 对马铃薯 PPO 的抑制作用表现为不可逆效应的实验结果和在  $200\sim 800\text{nm}$  范围扫描酶促反应发现生成除产物之外其它的一种可能是酶蛋白-Cys-多巴醌结合物的实验结果,我们认为 L-Cys 也可与马铃薯 PPO 酶蛋白不可

逆地结合从而抑制其酶促反应。因此, L-Cys 抑制马铃薯 PPO 的作用机理在于它既可作用于产物多巴醌生成稳定的无色物质又可通过与酶蛋白不可逆结合而作用于酶蛋白。

#### 参考文献:

- [1] 赵会全, 刘望夷. 酪氨酸酶的分子生物学研究进展[J]. 国外医学分子生物学分册, 1999, 13(6): 273-292.
- [2] Iyidogan NF, Bayindir A. Effect of L-cysteine, kojic acid and 4-hexylresorcinol combination on inhibition of enzymatic browning in Amasya apple juice[J]. J Food Engineering, 2004, 62: 299-304.
- [3] Christine R, Florence R, Claude R, et al. A kinetic study of the inhibition of palmito polyphenol oxidase by L-Cysteine[J]. Int J Biochem Cell Biol, 1996, 28(4): 457-463.
- [4] 黄璜, 刘晓丹, 陈清西. 苯甲醛族化合物对蘑菇酪氨酸酶抑制作用的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2003, 42(1): 98-101.
- [5] Jimenez M, Chazarra S, Escibano J, et al. Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(8): 4060-4063.
- [6] Valero E, Varon R, Garcia-Carmona F. A kinetic study of irreversible enzyme inhibition by an inhibitor that is rendered unstable by enzymatic catalysis[J]. Biochem J, 1991, 277: 869-874.
- [7] Richard-Forget F C, Goupy G M, Nicolas J J. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 2. Kinetic studies[J]. J Agric Food Chem, 1992, 40: 2108-2113.
- [8] Juan C E, Harry J W. Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in vitro[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1544: 289-300.



## 5 大生物技术成未来 15 年前沿技术重点研究领域

生物技术和生命科学将成为 21 世纪引发新科技革命的重要推动力量。国务院日前发布的《国家中长期科学和技术发展规划纲要(2006~2020 年)》(以下简称《纲要》)中提出了五项生物技术作为未来 15 年我国前沿技术的重点研究领域。

这五项生物前沿技术分别是:

——靶标发现技术。靶标的发现对发展创新药物、生物诊断和生物治疗技术具有重要意义。重点研究生理和病理过程中关键基因功能及其调控网络的规模化识别,突破疾病相关基因的功能识别、表达调控及靶标筛查和确证技术,“从基因到药物”的新药创制技术。

——动植物品种与药物分子设计技术。动植物品种与药物分子设计是基于生物大分子三维结构的分子对接、分子模拟以及分子设计技术。重点研究蛋白质与细胞动态过程生物信息分析、整合、模拟技术,动植物品种与药物虚拟设计技术,动植物品种生长与药物代谢工程模拟技术,计算机辅助组合化合物库设计、合成和筛选等技术。

——基因操作和蛋白质工程技术。基因操作技术是基因资源利用的关键技术。蛋白质工程是高效利用基因产物的重要途径。重点研究基因的高效表达及其调控技术、染色体结构与定位整合技术、编码蛋白基因的人工设计与改造技术、蛋白质肽链的修饰及改构技术、蛋白质结构解析技术、蛋白质规模化分离纯化技术。

——基于干细胞的人体组织工程技术。干细胞技术可在体外培养干细胞,定向诱导分化为各种组织细胞供临床所需,也可在体外构建出人体器官,用于替代与修复性治疗。重点研究治疗性克隆技术,干细胞体外建系和定向诱导技术,人体结构组织体外构建与规模化生产技术,人体多细胞复杂结构组织构建与缺损修复技术和生物制造技术。

——新一代工业生物技术。生物催化和生物转化是新一代工业生物技术的主体。重点研究功能菌株大规模筛选技术,生物催化剂定向改造技术,规模化工业生产的生物催化技术系统,清洁转化介质创制技术及工业化成套转化技术。

有关专家指出,基因组学和蛋白质组学研究正在引领生物技术向系统化研究方向发展,基因组序列测定与基因结构分析已转向功能基因组研究以及功能基因的发现和应用;药物及动植物品种的分子定向设计与构建已成为种质和药物研究的重要方向;生物芯片、干细胞和组织工程等前沿技术研究与应用,孕育着诊断、治疗及再生医学的重大突破。我国必须在功能基因组、蛋白质组、干细胞与治疗性克隆、组织工程、生物催化与转化技术等方面取得关键性突破。